

EDICIÓN 2017

LIBRO DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS EN SALUD



LIBRO DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS EN SALUD

EDICIÓN 2017

FACULTAD DE MEDICINA - UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Mariano Moreno 1240

+54 379 442 2290 / 442 3155

info@med.unne.edu.ar

med.unne.edu.ar



 **FACULTAD
DE MEDICINA**
Universidad Nacional
del Nordeste

HIPERTENSIÓN GESTACIONAL: EVALUACIÓN CLÍNICA, PERFIL PROTEINURICO Y EXPRESIÓN PLACENTARIA DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (i-NOS).

Pizzorno Villalba, Julieta A; López, Guadalupe A.; Bastera, María C; Rivero, Mabel I; Aguirre, María V.

RESUMEN

La hipertensión gestacional se caracteriza por hipertensión arterial con cifras tensionales sistólicas de 140 mmHg o más y diastólicas de 90 mmHg o más en 2 mediciones consecutivas de 4 horas de diferencia. La presencia de proteinuria de más de 300 mg/ 24 horas la agrupa en un síndrome denominado preeclampsia (PE). Los objetivos fueron estudiar y comparar parámetros clínicos/bioquímicos, perfil proteinúrico, características histopatológicas (HP) e Inmunohistoquímica (IHQ) de i-NOS en placentas. Estudió prospectivo transversal observacional comparativo, se incluyeron primigestas, mayores a 24 semanas, que asistieron al Servicio de Tocoginecología del Hospital Llano de Corrientes, de Marzo 2016 - Marzo 2017. Dos grupos distribuidos en: control embarazos no complicados y en casos hipertensos. Las variables se evaluaron, aplicando el Software IBM SPSS 21. Población total: 12 pacientes, 5 pacientes hipertensas (3 con PE) y 7 pacientes Controles (58,3%) y edad: $26,00 \pm 6,48$ vs $19,86 \pm 3,53$ años; PAS: $145,40 \pm 6,69$ vs $115,71 \pm 12,72$ mmHg ($p < 0,001$); PAD: $88,80 \pm 6,72$ vs $75,71 \pm 9,76$ mmHg ($p < 0,028$); PA Media (PAM): $107,67 \pm 6,56$ vs $89,03 \pm 10,12$ mmHg ($p < 0,005$); los valores bioquímicos: Proteinemia: $5,50$ vs $6,17 \pm 0,27$ g/dl; Albuminemia: $3,10$ vs $3,36 \pm 0,22$ g/dl; Proteinuria: $1,87 \pm 1,54$ vs $0,10 \pm 0,05$ g/24hs ($p < 0,001$); Creatinuria: $1,62 \pm 0,70$ vs $1,73 \pm 0,43$ g/24hs; Presión Coloidosmótica (PCO): $15,43 \pm 1,67$ vs $16,56 \pm 0,73$ mmHg; Índice de Briones (PCO/PAM): $0,14 \pm 0,02$ vs $0,19 \pm 0,02$ ($p < 0,013$). En PE la HP encontró proliferación de la capa subintimal y nudos sincitiales. El perfil proteinúrico de hipertensas, evidencia proteínas compatibles con albúmina (65 kDa) y abundante polipéptidos (50 kDa). El grosor placentario fue mayor en PE ($p < 0,024$). En la IHQ, iNOS tuvo mayor expresión en muestras controles con PE, localizada en los trofoblastos. Esto sugiere que iNOS podría intervenir en los mecanismos del flujo sanguíneo placentario reducido y la resistencia a la circulación feto-placentaria.

ABSTRACT

Pre-eclampsia (PE) is one of the hypertensive disorders of pregnancy characterized by blood pressure (BP) $>140/90$ mmHg and 24-hour proteinuria ≥ 0.3 g. The study's

objectives were to study and compare clinical/biochemical parameters, urinary protein electrophoresis profile (UPEP), histopathological (HP) and immunohistochemical (IHQ) characteristics of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in placentas. Prospective, cross-sectional, observational and comparative study. Primigravidae over 24 weeks were included, who attended the Tocogynecology Service of the Hospital Llano de Corrientes, March 2016 - March 2017. Uncomplicated pregnancies were distributed in one control group and in another, hypertensive cases. The variables were analyzed with IBM SPSS 21 Software. SAMPLES: 12 patients, 5 hypertensive (3 with PE) and 7 patients Controls, age: 26.00 ± 6.48 vs 19.86 ± 3.53 years; systolic BP: 145.40 ± 6.69 vs 115.71 ± 12.72 mmHg ($p < 0.001$); diastolic BP: 88.80 ± 6.72 vs 75.71 ± 9.76 mmHg ($p < 0.028$); Mean BP: 107.67 ± 6.56 vs 89.03 ± 10.12 mmHg ($p < 0.005$); biochemical values: Proteinemia: 5.50 vs 6.17 ± 0.27 g/dL; Serum albumin: 3.10 vs 3.36 ± 0.22 g/dL; Proteinuria: 1.87 ± 1.54 vs 0.10 ± 0.05 g/24hs ($p < 0.001$); Creatinuria: 1.62 ± 0.70 vs 1.73 ± 0.43 g/24hs; Oncotic pressure (OP) 15.43 ± 1.67 vs 16.56 ± 0.73 mmHg; Briones Index (OP/Mean BP): 0.14 ± 0.02 vs 0.19 ± 0.02 ($p < 0.013$). HP in PE: subintimal layer proliferation and syncytial knots. UPEP in hypertension: compatible with albumin (65 kDa) and abundant polypeptides (50 kDa). Placental thickness was higher in PE ($p < 0.024$). IHQ: iNOS had less expression in PE cases. This suggests that iNOS may intervene in the mechanisms of placental blood flow and resistance to fetal-placental circulation.

INTRODUCCIÓN

La hipertensión gestacional se caracteriza por hipertensión arterial con cifras tensionales sistólicas de 140 mmHg o más y diastólicas de 90 mmHg o más en 2 mediciones consecutivas de 4 horas de diferencia. La presencia de proteinuria de más de 300 mg/ 24 horas la agrupa en un síndrome denominado preeclampsia (PE) que usualmente debuta (o agrava la hipertensión pre-gestacional) a partir de las 20 semanas de embarazo. Este trastorno hipertensivo en el embarazo, constituye la causa principal de morbilidad materna y perinatal en todo el mundo. (1; 2)

La fisiopatología de la PE no es del todo comprendida, se la describe como una enfermedad, donde los mecanismos compensatorios y fisiológicos se encuentran alterados. Se genera una insuficiencia placentaria, y daño del sincitiotrofoblasto con restricción del crecimiento fetal, disminución de perfusión útero-placentaria, aumento de la hipoxia y del estrés oxidativo, siendo este último uno de los causantes finales del daño endotelial. (1)

Es interesante el rol del NO en la placenta, que no solo colabora en la formación de un endotelio sano, sino que promueve el proceso de invasión citotrofoblástica y regula el flujo sanguíneo feto y útero placentario (3). Por lo que un defecto en la síntesis, liberación o acción del NO podría producir las alteraciones vasculares observadas y eventualmente el síndrome clínico. (5)

Con los fundamentos previamente expresados, sumado al impacto que conlleva esta patología en la madre y en el feto con el aumento de su incidencia, es de gran importancia ampliar los conocimientos de factores asociados a la patogenia de la enfermedad como así también conocer las características clínicas que presentan las pacientes; y de esta manera contribuir a un mejor diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivos generales:

Estudiar las características anatomo- clínicas de las pacientes concurrentes al Servicio de Tocoginecología del Hospital Ángela I. de Llano de la ciudad de Corrientes en el periodo Marzo 2016 - Marzo 2017 que cumplen los criterios de inclusión para el estudio y comparar los parámetros clínicos/ bioquímicos contra controles. Indagar sobre las bases moleculares de la disfunción microvascular placentaria a través de la evaluación de la expresión de i-NOS entre ambos grupos.

Objetivos particulares:

Recabar datos clínicos y de factores de riesgo de hipertensión en el embarazo de pacientes a partir de 24 semanas de gestación. Calcular la Presión Coloidosmótica media y las Fuerzas de Starling para la evaluación de la fuga capilar a nivel placentario. Describir las características histopatológicas distintivas en muestras placentarias de mujeres preeclámpticas con respecto a las normogestantes. Analizar la expresión de i-NOS en tejido placentario de mujeres gestantes normales y preeclámpticas. Comparar los patrones electroforéticos de orinas de mujeres embarazadas hipertensas y con preeclampsia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio longitudinal observacional comparativo. Muestreo no probabilístico por conveniencia. Se incluyeron embarazadas concurrentes al Servicio de Tocoginecología del Hospital Ángela Iglesia de Llano de la Provincia de Corrientes, Argentina desde el mes de Marzo 2016 - Marzo 2017 según criterio de selección consecutiva. Las pacientes firmaron un consentimiento informado, el cuál fue avalado por el comité de Docencia e Investigación del referente nosocomio.

Criterios de inclusión:

Primigestas, gestantes de más de 24 semanas. *Criterios de exclusión: pacientes con hipertensión pre gestacional, diabéticas y con enfermedad renal.

Obtuvimos una población total de doce pacientes, a las cuales se las dividió en dos grupos para el análisis estadístico:

El grupo casos fue representado por cinco paciente, y las siete restantes conformaron el grupo control.

Teniendo como Criterio de inclusión para el grupo casos:

Presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg o presión arterial diastólica ≥ 90 mmHg en dos tomas, con un intervalo de 4 horas, en pacientes normotensas previamente. A su vez este grupo fue subdividido en pacientes con PE según la presencia de proteinuria de ≥ 0.3 gramos en muestra urinaria, obteniendo un total de tres pacientes.

Datos anatomo-clínicos:

Edad (años), medidas antropométricas (peso, talla, IMC), edad gestacional (según FUM y ecografía), presión arterial (mmHg), frecuencia cardíaca.

Determinación de la fuga capilar (fuerzas de perfusión de Starling):

Se calculó la presión coloidosmótica mediante la fórmula de Landis-Pappenheimer. El índice de Briones se determinó a partir de la relación entre PCO entre la PAM (Briones y col, 2000). (4)

Determinaciones bioquímicas:

Calcemia, uricemia, creatinemia, proteinemia total, albuminemia, glucemia, creatinuria/24 horas y proteinuria/24 horas.

Evaluación placentaria:

Se registraron las características morfológicas y pesos de las placentas.

Evaluación histopatológica:

Las muestras placentarias fijadas en formol bufferado al 10% se tiñeron con hematoxilina/eosina. Fueron examinadas a doble ciego por distintos observadores, registrándose microfotografías con Cámara Olympus Coolpix (magnificación: x100, x 400).

Inmunohistoquímica de iNOS en placenta:

Los cortes placenta (4 μ m) fueron incubados con anticuerpo policlonal de conejo anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, INC. CA), en dos diluciones a ensayar: 1/100 y 1/200; durante 18hs a 4°C. i-NOS fue detectada, utilizando anticuerpo secundario biotinilado.

Electroforesis de proteínas urinarias en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecil sulfato de sodio (SDS). Según método de Laemmli (1970).

Cálculos estadísticos:

Las variables cualitativas se expresaron en porcentajes. Las variables cuantitativas se presentan como media y desvío standard, se compararon con el método de T de Student. Se consideraron significativas con el valor de $p < 0.05$. Los análisis se realizaron aplicando el Software IBM SPSS Statistics 21.

RESULTADOS

Se evaluaron un total de doce pacientes distribuidas en dos grupos: el grupo control conformado por siete embarazos no complicados (58,3%) y cinco pacientes representaron al grupo de casos (41,7%), siendo el 25% de la población total pacientes con preeclampsia (PE). La edad media del grupo control fue $19,86 \pm 3,53$ años y del grupo de hipertensas $26,00 \pm 6,48$.

Datos anatómo-clínicos:

Las características clínicas de las pacientes incluidas en el estudio se muestran en la Tabla I. Al compararse las medias de ambos grupos a través de la T de Student, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la Proteinuria ($p < 0,020$), Presión Arterial (PA) sistólica ($p < 0,001$), una PA diastólica ($p < 0,028$), PA Media ($p < 0,005$) y el Índice de Briones ($p < 0,013$).

Determinación de la fuga capilar (fuerzas de perfusión de Starling) e Índice de Briones:

La PCO del grupo de hipertensas relativamente menor que las pacientes normotensas. El Índice de Briones fue menor ($p < 0,013$) en los embarazos complicados con $0,14 \pm 0,20$ con respecto al grupo control, con una media de $0,19 \pm 0,02$.

Evaluación placentaria:

Anatomopatológicamente, el grosor placentario era significativamente mayor en el grupo con hipertensión en comparación con el control. ($p = 0,024$) No se hallaron diferencias significativas entre el tamaño y peso de las placentas entre ambos grupos.

Evaluación histopatológica:

En placentas de embarazadas normotensas, se observaron vasos sanguíneos sin capa muscular prominente (Figura I). Las vellosidades terminales no presentaron características evidentes de patología. (Figura II). En la muestra del tejido placentario tomado de una paciente con PE se reveló que a nivel de las vellosidades tronculares y terminales, existe reducción del calibre luminal de las arteriolas, oclusión de la luz y proliferación de la pared subintimal (Figura III). Hialinización y abundante proliferación de nudos sincitiales en las vellosidades terminales a las cuales se le otorgó 3 cruces (Figura IV), acompañadas de calcificaciones vasculares (Figura V).

Inmunohistoquímica de iNOS placentaria:

Se encontró mayor expresión de iNOS en las placenta de las normogestantes, lo cual pudo ser observado con dos diluciones ensayadas del anticuero primario anti i-NOS (1: 100 y 1: 200). Se representan las microfotografías de IHQ con la dilución 1:100 de ambos grupos en la Figura VI.

Electroforesis de proteínas urinarias (SDS-PAGE):

Gel ilustrativo de corrida electroforética de ocho pacientes hipertensas, dentro de las cuales tres fueron diagnosticadas como PE. Figura VII. Las pacientes con hipertensión y proteinuria (preeclámpticas) presentan notable excreción de proteínas compatibles con

albúmina (65 kDa). Adicionalmente se observa abundante presencia de polipéptidos de peso molecular aparente menores de 50 kDa.

Tabla I: Datos clínicos y determinaciones bioquímicas.

VARIABLES	NORMOTENSAS	HIPERTENSAS	SIG. BILATERAL
EDAD	$19,86 \pm 3,53$	$26,00 \pm 6,48$.059
IMC	$26,86 \pm 2,06$	$28,49 \pm 3,67$.412
CALCEMIA mg/dl	$8,97 \pm 0,61$	$6,98 \pm 4,12$.376
UREMIA mg/dl	$13,33 \pm 11,30$	$20,00 \pm 7,90$.297
CREATINEMIA mg/dl	$0,72 \pm 0,14$	$0,80 \pm 0,11$.333
PROTEINEMIA TOTAL g/dl	$6,16 \pm 0,27$	$5,75 \pm 0,62$.180
ALBUMINEMIA g/dl	$3,36 \pm 0,21$	$3,20 \pm 0,21$.310
GLUCEMIA (mg/dl)	$76,86 \pm 11,85$	$81,00 \pm 12,38$.596
CREATINURIA g/24HS	$1,73 \pm 0,43$	$1,62 \pm 0,70$.770
PROTEINURIA g/24HS	$0,09 \pm 0,04$	$1,87 \pm 1,54$.020
PCO	$16,55 \pm 0,73$	$15,43 \pm 1,67$.180
Índice de Briones	$0,18 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$.013
PAS en Parto	$115,71 \pm 12,72$	$145,40 \pm 6,69$.001
PAD en Parto	$75,71 \pm 9,75$	$88,80 \pm 6,72$.028
PAM en Parto	$89,03 \pm 10,11$	$107,67 \pm 6,56$.005

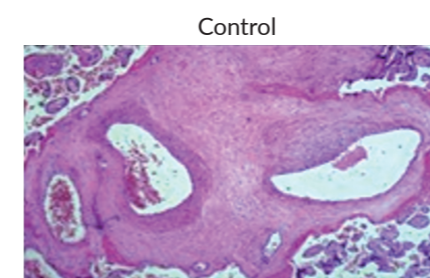


Figura I: 40x Arterias con revestimiento endotelial.

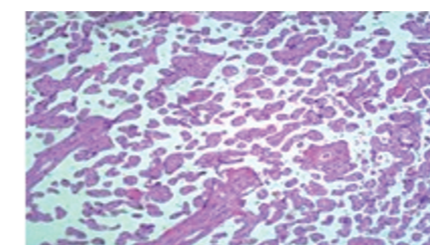


Figura II: 100x Vellosidades intermedias y terciarias.



Figura III: Hipertrofia muscular.

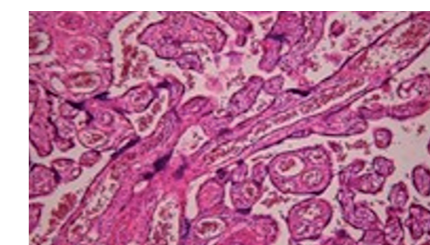


Figura IV: 100x Nudos sincitiales.

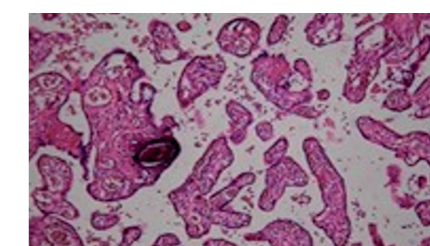


Figura V: 100x Clasificación.

Figuras: Microfotografías placentarias de PE y controles normales teñidos con H/E. Autoría propia

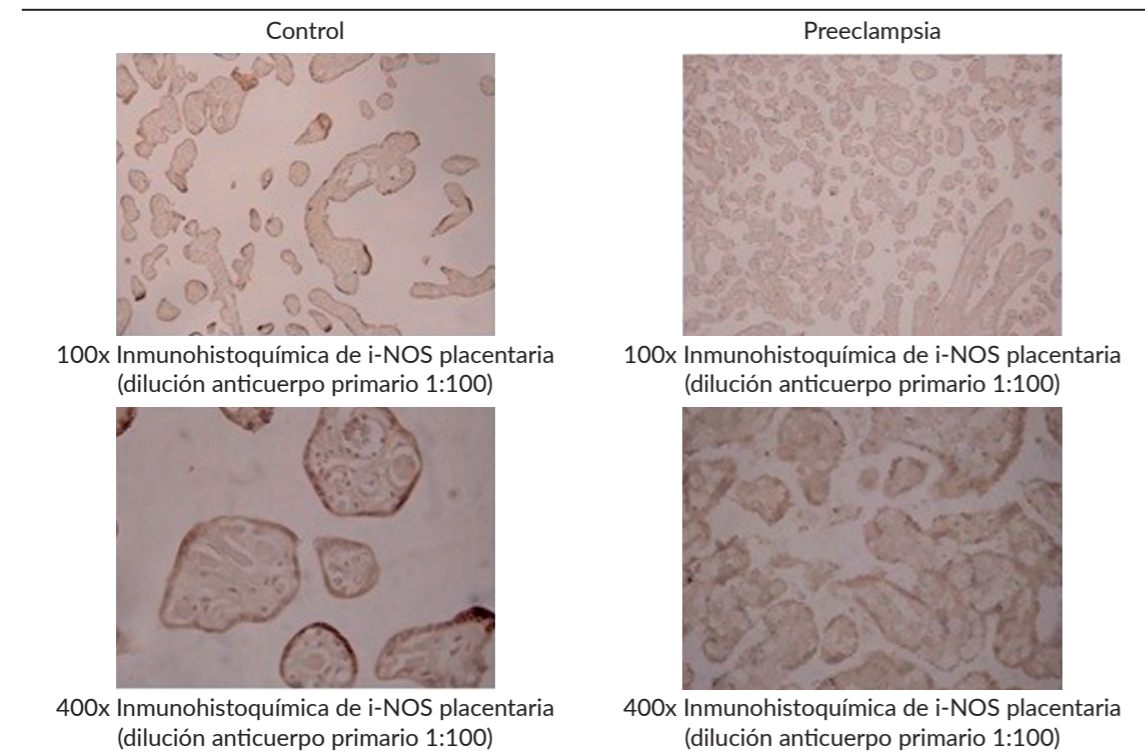


Figura VI: Microfotografías de inmunohistoquímicas de i-NOS placentarias de PE y controles normales. La coloración parda revela las zonas de inmunoreactividad de iNOS, intensamente marcadas en trofoblastos de placentas normales respecto a la preecláptica. Autoría propia

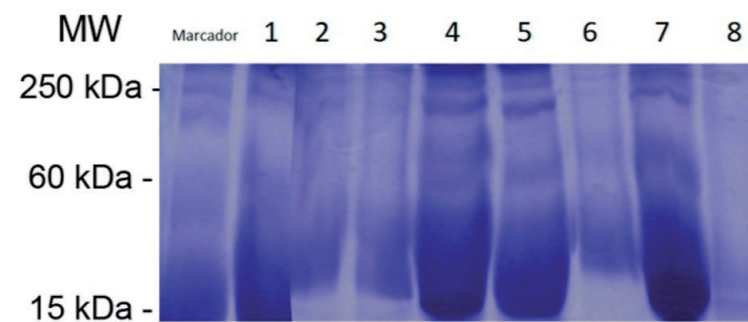


Figura VII: Electroforesis: De ocho pacientes hipertensas, dentro de las cuales tres fueron diagnosticadas con preeclampsia, correspondientes a la corrida 4, 5 y 7. Excreción de proteínas compatibles con albúmina (65 kDa) y abundante presencia de polipéptidos de peso molecular aparente menores de 50 kDa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En este trabajo preliminar se ha comenzado a estudiar las relaciones de los diferentes parámetros clínicos, bioquímicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos que se presentan en embarazadas con hipertensión y específicamente en la preeclampsia (PE) en

búsqueda de posibles predictores de la enfermedad y dilucidar el rol de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en la disfunción del endotelio placentario en comparación en embarazos no complicados.

Entendiendo que la presión coloidosmótica de las proteínas plasmáticas (PCO) disminuida en las embarazadas con PE explica la aparición clínica del edema, derrame de serosas, proteinuria y la hipovolemia de diversos grados que presentan las gestantes. En nuestro estudio obtuvimos valores disminuidos de la presión coloidosmótica y el índice de Briones en el grupo de hipertensas. Siendo esta última significativa entre ambos grupos.

En nuestro estudio no se presentaron diferencias entre el tamaño y peso de la placenta ni del recién nacido, los cuales en la literatura se encuentran disminuidos en embarazos con preeclampsia. Sin embargo, se halló aumento del grosor placentario de manera significativa ($p=0,024$) en preeclápticas en comparación con el grupo control. Lo cual se relaciona con lo postulado por Roberts y Escudero en 2012 (3), quienes fundamentan que el grosor es mayor en mujeres con PE por la alta velocidad del flujo sanguíneo en las arterias espiraladas, debido a la presencia de mayores fibras musculares en la capa intimal del vaso sanguíneo, que provoca daño en las vellosidades placentarias.

Con respecto al análisis histológico en las placentas de embarazadas normotensas, se observó claramente que los vasos sanguíneos están revestidos por endotelio, sin capa muscular prominente, lo que se debe a la remodelación fisiológica. Asegurando así una correcta distribución adecuada de la sangre materna a la unidad útero-placentaria en desarrollo (6). En la muestra del tejido placentario tomado de una paciente con PE se reveló que existe reducción del calibre luminal de las arteriolas, oclusión de la luz y proliferación de la pared subintimal. Algunas vellosidades presentaron hialinización y se encontró abundante proliferación de nudos sincitiales en las vellosidades terminales, lo que se relaciona con lo propuesto por Benirschke, quien fundamenta que cuando más del 30% de las vellosidades terciarias presentan brotes sincitiales, en especial en embarazos prematuros, se trata de un diagnóstico de compromiso en la perfusión (7).

En cuanto al estudio inmunohistoquímico y evaluación de la expresión de iNOS en ambos grupos, se observó una marcada disminución de iNOS en la placenta con PE.

Se describe el daño a nivel glomerular en embarazos asociados a una elevada tensión arterial, siendo que la presencia de proteinuria (preeclápticas) demostró mediante electroforesis una notable excreción de proteínas compatibles con albúmina (65 kDa). Adicionalmente se observa abundante presencia de polipéptidos de peso molecular aparente menores de 50 kDa, dado por el aumento de filtración glomerular en estas pacientes.

Se continuará este estudio para profundizar y validar nuestras conclusiones preliminares con la intención de contribuir con la integración de nuevas evidencias desde las ciencias

básicas y la clínica, potencialmente aplicables al diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la hipertensión en el embarazo y específicamente en la preeclampsia.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina UNNE, que aportó el ámbito adecuado para la realización de este trabajo. A la SECyT UNNE por el subsidio correspondiente al proyecto 17/I009-12 y por la beca de Pregrado otorgada a la Srta. Julieta A. Pizzorno Villalba. Se agradece además a los Dres Zibelman de Gorodner Ofelia y Roa Domingo Maidana (Cátedra de Histología y Embriología II – Fac. Medicina, UNNE), Todaro Juan Santiago, Rodriguez Juan Pablo, Melana Juan Pablo, Ma. Inés Delfino y Eduardo Perna por sus aportes en relación al tema. Al Hospital A. I. de Llano por permitirnos realizar y continuar con estudio, a los residentes y las secretarias del Servicio de Tocoginecología del correspondiente nosocomio por su colaboración en el proceso de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gómez Carbajal L. Actualización en la fisiopatología de la preeclampsia. Simposio Preeclampsia; Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia. 2014; vol. 60 no. 4: 321-331.
2. Canache B, Colmenares Barreto K., Duin Balza A., Hernández-Hernandez R. Niveles séricos de nitritos-nitratos en embarazadas con hipertensión gestacional y en pacientes con embarazos no complicados. Revista Latinoamericana de Hipertensión. 2012; Vol. 7 - Nº 1.
3. Roberts J, Escudero C. The placenta in preeclampsia. Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health. 2012;2(2):72-83
4. Briones-Garduño JC, Díaz León-Ponce M, Gómez Bravo-Topete E. Medición de la fuga capilar en la preeclampsia- eclampsia. Revista cirugía y cirujanos. 2000. Vol. 68, No 5. 68: 194-197.
5. Boutet M., Roland L., Thomas N., Bilodeau J. Specific systemic antioxidant response to preeclampsia in late pregnancy: the study of intracellular glutathione peroxidases in maternal and fetal blood. American Journal of Obstetrics & Gynecology. 2009 530 e1-7.
6. Khong T.Y.; W. M. Hague. "The placenta in maternal hyperhomocysteinaemia" Br J Obstet Gynaecol. 1999; 106: 273-8.
7. Benirshke K.; P. Kaufmann. "Maternal Diseases complicating pregnancy: diabetes, tumors, preeclampsia, lupus anticoagulant" Pathology of the Human Placenta. New York: Springer-Verlag. 2000; 523-90.